

氏名	永山 学
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 618 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	クローン病の小腸細菌叢解析とクローン病関連菌によるマウス腸管免疫細胞の誘導
論文審査委員	(委員長) 教授 眞嶋 浩 聡 (委員) 教授 堀江 久 永 教授 熊谷 秀 規

論文内容の要旨

1 研究目的

クローン病は主に回腸と大腸を侵す原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、日本を含む東アジア諸国で患者数が増加しており問題となっている。腸管免疫系の過剰な活性化が病態の主体と考えられているが、そのメカニズムは明らかとなっていない。近年、腸内細菌が本疾患に関わることが示唆されているが、主に糞便細菌叢の解析であり、これまでに小腸細菌叢を対象とした詳細な解析はなされていない。本研究の目的は、これまでに明らかとなっていないクローン病の小腸細菌叢を解析して本疾患の病態に関わる細菌を特定することである。そのために、まず採取方法や挿入経路の影響を明らかにするために小腸細菌叢解析の基礎的検討を行なった。次に、クローン病患者と対照患者（非クローン病患者）の小腸粘膜細菌叢を統計学的に比較解析することによりクローン病関連菌を特定した。さらに、統計学的な菌叢解析により明らかとなったクローン病関連菌の腸管免疫系への影響について無菌マウスを用いて解析を行なった。

2 研究方法

クローン病患者と非クローン病患者からダブルバルーン内視鏡を用いて小腸粘膜サンプルを採取した。細菌叢の比較のために小腸液、糞便、唾液も採取した。試料から DNA を抽出し、Illumina MiSeq を用いて 16S rRNA メタ解析で菌叢データを取得し統計学的解析を行った。クローン病患者の小腸粘膜サンプルから単離したクローン病関連菌を無菌マウスに投与することによりノトバイオトマウスを作出し、クローン病関連菌による腸管免疫細胞への影響をフローサイトメトリーによって解析した。

3 研究成果

小腸細菌叢の採取方法の比較を行なったところ、小腸粘膜サンプルと小腸液サンプルは細菌の多様度に差は見られなかったが、細菌構成に有意差を認めた。また、同一症例における解析では挿入経路（経口的、経肛門的）の違いは細菌叢に影響を与えたが、異なる症例との比較では挿入経路による有意な影響を認めなかった。

クローン病患者 27 例、非クローン病患者 17 例の小腸粘膜サンプルを用いた菌叢比較により、

クローン病患者の小腸粘膜では Enterobacteriaceae 科, Ruminococcaceae 科, Streptococcus 科が有意に増加していた. 種レベルの解析 (LEfSe, 多重検定) では 18 菌種 (または菌株) がクローン病患者の小腸粘膜で増加していた. そのうち *Escherichia coli* と *Ruminococcus gnavus* はいずれの解析でも抽出された. また, *E. coli* と *R. gnavus* は小腸液よりも小腸粘膜サンプルに多く見られるとともに, 小腸狭窄を有する症例や抗 TNF α 抗体製剤による治療中の症例でより *E. coli* を含む Enterobacteriaceae 科が多く見られた.

クローン病患者の小腸粘膜サンプルから合計 80 菌株を単離した. この 80 菌株にはクローン病の小腸粘膜に多い上記 18 菌種のうち 9 菌株 (*E. coli*, *R. gnavus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Erysipelatoclostridium ramosum*, *Bacteroides dorei*, *B. fragilis*, *B. uniformis*, *Parabacteroides distasonis*, *Streptococcus pasteurianus*) が含まれており, この 9 菌株を無菌マウスに経口投与したところ, 腸管粘膜固有層において TH1 細胞の著明な誘導と, TH17 細胞の軽度の誘導を認めた. 9 菌株のうち *E. coli* 35A1 株を単菌で無菌マウスに投与したところ, 9 菌株や SPF 環境飼育マウスと同等の強い TH1 細胞誘導能を示した. 一方, 実験用 *E. coli* K-12 に属する MG1655 株やクローン病由来 adherent-invasive *E. coli* (AIEC) である LF82 株では軽度な TH1 細胞誘導にとどまったことから, *E. coli* 35A1 株による TH1 細胞誘導能は菌株依存的なものであった.

4 考察

小腸細菌叢は粘膜サンプルと管腔サンプルで異なることが示された. これまでに粘膜に付着する細菌が宿主腸管免疫に影響することが報告されていることから, 本研究のクローン病の小腸細菌叢解析には粘膜サンプルを用いた. 同一症例での解析では挿入経路による細菌叢への影響が見られ, その理由として経肛門の挿入時の腸管洗浄の影響や採取部位が厳密には異なるためと考えられた. 一方, 異なる症例との比較においては挿入経路による差は認められなかった. これは挿入経路による差以上に個人間の細菌叢の差が大きいことによるためと推測された. このことから個人間比較を主たる目的とする本研究ではいずれの挿入経路も対象に含めて解析を行なった.

これまでに *E. coli* と *R. gnavus* はクローン病患者の糞便や終末回腸に多いことが報告されており, 今回の小腸細菌叢の比較解析の結果もこれと合致するものであったが, 糞便細菌叢の解析ではこれら *E. coli* と *R. gnavus* は抽出されてこなかった. その理由としてサンプル数の問題も考えられるが, 病変が存在する小腸の方がより検出感度が高いことによると考えられた. また, *E. coli* と *R. gnavus* は管腔細菌叢よりも粘膜細菌叢で多く認められた. これまでにクローン病関連 *E. coli* である LF82 株では腸上皮への接着能や侵入能が報告されており, クローン病関連 *E. coli* に共通する特徴であると考えられた. さらに, 有狭窄症例や抗 TNF α 抗体製剤で治療中の群で *E. coli* を含む Enterobacteriaceae 科が多く存在した. AIEC の長期感染が腸管の線維化を誘導するという報告もなされており, クローン病関連 *E. coli* がクローン病に見られる線維化や炎症誘導に関連している可能性が示唆された.

無菌マウスを用いた解析により, クローン病関連菌 9 菌株はマウスの大腸粘膜固有層の TH1 細胞を強く誘導するとともに, 軽度の TH17 細胞誘導能を有することが示された. 9 菌株のうち *E. coli* 35A1 株は 9 菌株や SPF 環境飼育マウスと同等の TH1 細胞誘導能を示したことから, TH1 細胞誘導における主要な役割を果たしていると考えられた. さらに *E. coli* の MG1655 株や LF82 株よりも強い TH1 細胞誘導能を示したことから, 菌株依存的なメカニズムを有することが示唆され

た。

5 結論

小腸粘膜細菌叢の解析により明らかとなったクローン病関連細菌は腸管粘膜固有層における TH1 細胞の誘導能を有していたことから、腸内細菌の宿主免疫への影響がクローン病の病態に関連していることが示唆された。このことから、このクローン病の小腸粘膜に存在する炎症誘導性細菌はクローン病の新規治療ターゲットの可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

クローン病は全消化管を侵す原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、主に小腸と大腸に炎症を及ぼす。腸管免疫の異常が病態に深く関与しており、腸内細菌叢の関与も示唆されている。これまでの報告は、主に糞便を使った腸内細菌叢の報告であったが、申請者らは小腸粘膜細菌叢がクローン病に関連しているのではないかと考え、ダブルバルーン内視鏡下に得られた検体をもとに小腸粘膜細菌叢を解析した。新たな視点からの独創的な研究であり、以下を明らかにした。

1. 粘膜サンプルと腸液サンプルでは細菌の多様度に差はないが、細菌の構成には差がある。同一症例では挿入経路（径口的、径肛門的）によって得られたサンプルの細菌構成は異なっていたが、個人間の比較では挿入経路の影響はみられなかった。
2. クローン病患者（CD）と非クローン病患者（NC）の小腸粘膜サンプルを比較し、CDの小腸粘膜では Enterobacteriaceae 科、Ruminococcaceae 科、Streptococcus 科が有意に増加していること、種レベルでは 18 菌種が増加していることを明らかにした。その中でも *Escherichia coli* (*E. coli*)と *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*)は 3 種の解析全てで抽出された。逆に CD の小腸粘膜では 25 菌種が減少しており、*Streptococcus mitis*、*Abiotrophia para-adiacens*、*Gemella sanguinis* の 3 菌種は 2 種の解析で共通して抽出された。
3. *E. coli*と *R. gnavus*は小腸液よりも小腸粘膜に多くみられた。CD の中でも小腸狭窄を有する症例や抗 TNF- α 抗体製剤による治療中の症例に Enterobacteriaceae 科の細菌が多くみられ、病原性との関連が示唆された。但し、この 2 種の細菌は糞便サンプルでは CD と DC に差を認めなかった。
4. CD の小腸粘膜サンプルから 80 菌株を単離した。この中には CD の小腸粘膜に多い 18 菌種のうち 9 菌株が含まれていた。この 9 菌株を無菌マウスに投与すると腸管粘膜固有層において TH1 細胞の著明な誘導を認めた。*E. coli* 35A1 株を単独で無菌マウスに投与すると同様に強い TH1 細胞誘導能を認めたが、クローン病関連大腸菌として知られる adherent-invasive *E. coli* LF82 株は弱い誘導能しか示さなかった。

以上の検討から、申請者は CD と NC の小腸粘膜の細菌叢を比較することで、CD で有意に増加または減少している菌種を同定した。その中で増加している菌種に着目し、菌株を単離した。無菌マウスに投与して腸管粘膜固有層における CD4 陽性 T 細胞の誘導能を検討し、*E. coli* 35A1 株が強い TH1 細胞誘導能を有していることを証明した。この菌株は糞便の細菌叢を比較することでは同定しえない菌株であり、非常にユニークな研究と言える。今後はこの菌株の更なる細菌学的な解析や病原性の解析が待たれるところである。また、本当にクローン病の発症と関連しているのか、研究の更なる発展に期待したい。

本研究は精力的になされており、大筋で問題なかったが、いくつかの修正を指示した。

1. 動物実験計画の承認の記載
2. 内視鏡検査の前処置に関する記載、検査日に関する記載
3. 研究に用いた検体の詳細
4. CD で減少している菌種の記載
5. *E. coli* 35A1 株などが持つ TH1 細胞誘導能は大腸粘膜で見られるが、小腸粘膜ではみられないことの考察
6. 本研究の限界の記載の追加
7. 図のカラー化、投稿論文とは異なる図の差し替え
8. 表の修正

これらは全て適切に修正された。修正論文に問題はなく、合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

クローン病は全消化管を侵す原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、主に小腸と大腸に炎症を及ぼす。腸管免疫の異常が病態に深く関与しており、腸内細菌叢の関与も示唆されている。これまでの報告は、主に糞便を使った腸内細菌叢の報告であったが、申請者らは小腸粘膜細菌叢がクローン病に関連しているのではないかと考え、ダブルバルーン内視鏡下に得られた検体をもとに小腸粘膜細菌叢を解析した。新たな視点からの独創的な研究であり、以下を明らかにした。

1. 粘膜サンプルと腸液サンプルでは細菌の多様度に差はないが、細菌の構成には差がある。同一症例では挿入経路（径口的、径肛門的）によって得られたサンプルの細菌構成は異なっていたが、個人間の比較では挿入経路の影響はみられなかった。
2. クローン病患者（CD）と非クローン病患者（NC）の小腸粘膜サンプルを比較し、CD の小腸粘膜では *Enterobacteriaceae* 科、*Ruminococcaceae* 科、*Streptococcus* 科が有意に増加していること、種レベルでは 18 菌種が増加していることを明らかにした。その中でも *Escherichia coli* (*E. coli*)と *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*)は 3 種の解析全てで抽出された。逆に CD の小腸粘膜では 25 菌種が減少しており、*Streptococcus mitis*、*Abiotrophia para-adiacens*、*Gemella sanguinis* の 3 菌種は 2 種の解析で共通して抽出された。
3. *E. coli* と *R. gnavus* は小腸液よりも小腸粘膜に多くみられた。CD の中でも小腸狭窄を有する症例や抗 TNF- α 抗体製剤による治療中の症例に *Enterobacteriaceae* 科の細菌が多くみられ、病原性との関連が示唆された。但し、この 2 種の細菌は糞便サンプルでは CD と DC に差を認めなかった。
4. CD の小腸粘膜サンプルから 80 菌株を単離した。この中には CD の小腸粘膜に多い 18 菌種のうち 9 菌株が含まれていた。この 9 菌株を無菌マウスに投与すると腸管粘膜固有層において TH1 細胞の著明な誘導を認めた。*E. coli* 35A1 株を単独で無菌マウスに投与すると同様に強い TH1 細胞誘導能を認めたが、クローン病関連大腸菌として知られる adherent-invasive *E. coli* LF82 株は弱い誘導能しか示さなかった。

以上の検討から、申請者は CD と NC の小腸粘膜の細菌叢を比較することで、CD で有意に増加または減少している菌種を同定した。その中で増加している菌種に着目し、菌株を単離した。

無菌マウスに投与して腸管粘膜固有層における CD4 陽性 T 細胞の誘導能を検討し、*E. coli* 35A1 株が強い TH1 細胞誘導能を有していることを証明した。この菌株は糞便の細菌叢を比較することでは同定しえない菌株であり、非常にユニークな研究と言える。今後はこの菌株の更なる細菌学的な解析や病原性の解析が待たれるところである。また、本当にクローン病の発症と関連しているのか、研究の更なる発展に期待したい。

本研究は精力的になされており、大筋で問題なかったが、いくつかの修正を指示した。

1. 動物実験計画の承認の記載
2. 内視鏡検査の前処置に関する記載、検査日に関する記載
3. 研究に用いた検体の詳細
4. CD で減少している菌種の記載
5. *E. coli* 35A1 株などが持つ TH1 細胞誘導能は大腸粘膜で見られるが、小腸粘膜ではみられないことの考察
6. 本研究の限界の記載の追加
7. 図のカラー化、投稿論文とは異なる図の差し替え
8. 表の修正

これらは全て適切に修正された。

プレゼンテーションは導入部がやや冗長で、その結果 30 分という発表制限時間内にまとめられなかったのは残念であった。しかし、研究内容をわかりやすく筋道をたてて発表することができ、説得力のあるものであった。質疑応答では明快に答えることができ、審査員に自身の考えを十分に理解させることができた。研究に対する真摯な姿勢も感じられ、今後の発展も期待できるものであった。

以上から、提出された修正論文、プレゼンテーションを総合的に判断し、合格と判定する。